



Biofizikální ústav Akademie věd České republiky  
**RNDr. Jiří Široký, CSc.**  
**Oddělení vývojové genetiky rostlin**  
**Královopolská 135, 612 65 Brno**  
tel. 541517194, fax: 541240500, e-mail:

siroky@ibp.cz

---

## **Oponentský posudek disertační práce Mgr. Jaroslava Kozáka „Studium mechanismů rekombinace DNA u rostlin“**

Mgr. Kozák si pro svoji práci zvolil náročné téma stanovení kinetiky oprav zlomů DNA u dvou modelových rostlinných druhů, *Arabidopsis thaliana* a *Physcomitrella patens*. Zaměřil se přitom zejména na úlohu jednotlivých konstituentů komplexu MRN, dále DNA ligáz 1 a 4 a posléze SMC komplexu.

Předložená práce představuje impozantní soubor šesti publikací, se záběrem tak širokým, že pro ne zcela poučeného čtenáře může představovat do jisté míry tvrdý oříšek, jednotlivými pracemi se prokousat. Nicméně tady disertant čtenáři příjemně usnadnil situaci: Na rozdíl od obvyklé praxe, že se do disertace sváží publikace a trochu se okomentují, Mgr. Kozák zařadil na začátek disertace přehledný úvod, kde systematicky třídí nejen typy poškození DNA, ale také jednotlivé mechanismy oprav jimiž rostliny pro různá poškození disponují. Po presentaci zmíněných publikací následuje oddíl diskuse. Mgr. Kozák tuto kapitolku vhodně začlenil a úspěšně se pokusil nahlédnout získané výsledky ve světle soudobých poznatků. Tato část mne velmi potěšila, neboť ve většině podobných disertací je buď souhrnná diskuse pouze pro zachování dekora anebo zcela chybí. Na druhé straně její přehlednost poněkud narušuje fakt, že je psána v pasivu a tak není na první pohled patrné, které výsledky patří týmu, jehož je Mgr. Kozák členem a které dalším skupinám. Situaci však vylepšuje závěr, kde autor nese kůži na trh a explicitně shrnuje zásadní poznatky ze svého studia.

Nejoriginálnější a průlomová se mi jeví práce v DNA Repair (2009), Rapid repair of DNA double strand breaks in *Arabidopsis*... Autoři srovnávají kinetiku reparací u mutantů klasické NHEJ dráhy (*atlig4-4* and *atku80*) a SMC členů *mim/Atrad18* a kleisinu *Atrad21.1* a uzavírají, že se jedná o dvě nezávislé reakce po indukci DSBs. Tato práce vyvolává značný

ohlas, je hojně citována a vskutku se zdá, že - přinejmenším u dvouděložných rostlin - existují mnohočetné opravné dráhy, respektive jedna s rychlou kinetikou závisící na přítomnosti proteinů SMC a kleisinu, a další pomalejší, kterou známe jako C-NHEJ. Ze schématu pokusu je jisté, že k efektivním masivním opravám dochází již během samotného hodinového působení radiomimetiky. Otázku na to, jakým algoritmem odlišujete onu reparaci během expozice MMC od následné reparace, nekladu (především proto, že jsem to nepochopil). Určitě jste na tuto otázku mnohokrát odpovídali a v budoucnosti ještě odpovídat budete. Ovšem, protože oponent je povinen otázky klásti, tady je první: v předmětné práci diskutujete možnosti ligace nehomologních konců DNA během např. V(D)J rekombinace při zrání lymfocytů (Yan et al. 2007) a další práce z oblasti savčí biologie, s jedinou výjimkou publikace na *Arabidopsis* - (Heacock et al. 2004). Tato práce se však zabývá poněkud speciálním případem, totiž rostlinami s kriticky zkrácenými telomerami jakožto vzdáleným a poněkud speciálním modelem DSBs na koncích chromosomů. Otázka tedy zní, zda existuje nějaký unifikující model či vaše představa, jak komplexní otázku reparace a rekombinace DNA u rostlin pojmout?

Velmi originální je práce v NA Res (2012), Kamisugi et al., kde autoři na modelu *Physcomitrella*, známém vysokým stupněm HR testují možnosti tvorby knock-out mutantů v jednotlivých konstituentech komplexu MRN. Při přípravě delta-mutací využili pokročilý systém Cre-lox. I když je mi známo, že disertant se zabývá zejména měřením genomového poškození metodikou one-cell electrophoresis a konkrétní transformace prováděli další členové týmu, položil bych přece jen otázku, proč jste využili systému Cre-lox a nikoli přirozené vlastnosti HR čepenky?

Celkově považuji předloženou disertaci za velmi zdařilou. Předložené publikace obsahují řadu zcela prioritních výsledků. Závěrem mi nezbývá, než konstatovat, že disertační práci doporučuji k obhajobě a že práce splňuje požadavky na dizertaci v daném oboru. Hodnotím ji jako vynikající a doporučuji na jejím základě udělit Mgr. Kozákovi vědecko-akademickou hodnost PhD.

V Brně 26. 2. 2016

Jiří Široký